

■ 研究課題名

異種間生殖系列キメラを用いた魚類の配偶子誘導に関する実証的研究

■ 研究の目的

本研究では、作物の生産に使われている「接ぎ木」、「花粉（葯）培養」、「胚珠培養」の技術を、生殖系列キメラを用いて養殖魚の種苗の生産に応用できるかどうかを実証しようとした。すなわち、①キンギョ等の淡水魚を使って、ウナギを含む様々な水産重要種の精子を作りだせるか、②異種を使った卵形成の限界が、種の遺伝的差によるか、種間にある繁殖特性の違いによるものか、③半数性、雑種のゲノム構成を持つ細胞から配偶子を作りだせるか、を検証した。



山羽悦郎

■ 研究項目・実施体制（◎は研究代表者）

- ①水産重要種での精子形成
（◎山羽悦郎／北海道大学北方生物圏フィールド科学センター、荒井克俊、足立伸次／北海道大学水産科学研究院）
- ②小型魚類を用いた配偶子形成
（◎山羽悦郎／北海道大学北方生物圏フィールド科学センター、荒井克俊／北海道大学水産科学研究院）
- ③倍数性を操作した始原生殖細胞からの配偶子形成
（◎山羽悦郎／北海道大学北方生物圏フィールド科学センター、荒井克俊／北海道大学水産科学研究院）

■ 研究の内容・主要な成果

- ①チョウザメ、ウナギ、コイ、シシャモ等 12 種類の水産重要種をドナーとして始原生殖細胞（PGC）を分離し、コイ目魚類に属するキンギョ、ゼブラフィッシュ、あるいはドジョウ宿主胚へ移植した。その結果、多くのドナー PGC は宿主生殖隆起へと移動したが、コイ目内の魚種を除いて精子へ分化する可能性は認められなかった。近縁種での精子形成は可能であるが、目を越える遠縁種での精子形成は困難と考えられた。（表 1）
- ②宿主としてのゼブラフィッシュの性は PGC の数によって決定されるという報告に対し、キンギョ、ドジョウでは、体細胞の性が生殖腺の性を決定することが明らかとなった。また、ドジョウの PGC、あるいはゼブラフィッシュの PGC をキンギョの胚へ移植した場合、卵形成が起こるものの周辺仁期で停止することが明らかとなった。（図 1）
- ③ドジョウ、キンギョ、ゼブラフィッシュ共に、半数性の PGC から機能的な精子が分化することが明らかとなり、動物においても植物の「花粉（葯）培養」に相当する育種が可能と考えられた。（図 2）

■ 今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ①半数性の PGC からの精子形成が可能であることを明らかにした。もし、卵形成が可能であれば、生殖系列キメラを介して一代でホモクローンあるいはヘテロクローン系統が樹立できる。
- ②コイの精子をキンギョで作ることが出来たことから、コイ半数体 PGC を用いたコイの系統の樹立をキンギョで行うことが可能と考えられる。
- ③近縁種の宿主を用いて、水産重要種の新品種の育成が可能となる。
- ④上記を総合して、魚類において、PGC と生殖系列キメラを利用して、植物での「接ぎ木」、「花粉培養」に相当する育種が可能となると考えられ、植物育種と同等の発展が期待できる。

■ 公表した主な特許・論文

- ①特願2010-026904(外国出願PCT/JP2011/052772)：生殖系列キメラを介して致死性魚類半数体に由来する生殖細胞から遺伝的に同一な配偶子を得る方法：国立大学法人北海道大学
- ②T. Fujimoto, et al. Developmental potential of embryonic cells in a nucleo-cytoplasmic hybrid formed using a goldfish haploid nucleus and loach egg cytoplasm. *Int. J. Dev. Biol.* 54 : 827-835 (2010)
- ③T. Fujimoto, et al. Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell deficient loach, a teleost fish. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA* 107(40) : 17211-17216 (2010)
- ④T. Saito, et al. Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *Int. J. Dev. Biol.* 54 : 1481-1486 (2010)
- ⑤T. Saito, T. et al. The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. *PLoS ONE* 6(9) : e24460 (2011)
- ⑥Y. Kawakami, et al. Viability and motility of vitrified/thawed primordial germ cell isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) somite embryos. *J. Anim. Sci.* Sep 16 (2011)

■ 研究成果の具体的図表

異種間生殖系列キメラを利用した魚類の配偶子誘導に関わる実証的研究

研究のねらい

栽培植物の育種技術

1. 接ぎ木
2. 花粉(葯)培養
3. 胚珠培養

動物で応用出来るか？

↓ 検証

異種間生殖系列キメラによる配偶子誘導

研究の進め方

- 1) 種を越えた精子形成にはどれ位の遺伝的な差が許容されるか
→ 水産重要魚種をドナーにした種間キメラ
- 2) 種を越えた卵形成の限界は種差か、宿主環境か
→ 宿主魚種の性決定解析と種間キメラ
- 3) 致死性個体の配偶子は、キメラによる *in vivo* 培養によって作り出せるのか
→ 倍数性を操作したPGCIによるキメラ

表1. 水産重要魚種をドナーにした種間キメラでの精子形成の解析結果

ドナー魚種	ドナー魚種の科	コイ目上の科	ホスト種	PGC 可塑性	キメラの誘導	PGCの維持	好性の判別
パールダニオ	ゼブラ魚	同属	ゼブラフィッシュ	○	○	○	○
キンギョ	コイ科	同科	ゼブラフィッシュ	○	○	○	○
コイ	コイ科	同科	ゼブラフィッシュ	△	○	×	—
コイ	コイ科	同科	ドジョウ	△	○	×	—
コイ	コイ科	同科	キンギョ	○	○	○	△
ドジョウ	コイ目	同目	ゼブラフィッシュ	○	○	○	○
ドジョウ	コイ目	同目	キンギョ	○	○	○	○
ワカサギ	サケ目	異目	キンギョ	○	○	×	—
キュウリウオ	サケ目	異目	キンギョ	○	○	×	—
シシャモ	サケ目	異目	キンギョ	○	○	×	—
ニシン	ニシン目	異目	ゼブラフィッシュ	○	×	×	—
ニシン	ニシン目	異目	キンギョ	○	×	—	—
ウナギ	ウナギ目	異目	ゼブラフィッシュ	○	○	×	×
マツカフ	カレイ目	異目	ゼブラフィッシュ	○	—	—	—
ホンガレイ	カレイ目	異目	—	△	—	—	—
チョウザメ	チョウザメ目	異系統	キンギョ	○	○	×	—

図1. 宿主魚種の性決定の解析と生殖系列キメラでの卵巣形成の確認

キンギョ対照 内在性PGCのノックダウン

ドジョウ、キンギョではPGCが無くても雌雄に分化することを、形態学的、組織学的、分子生物学的に確認

ゼブラフィッシュ、ドジョウのPGCを移植したキンギョ種間キメラで、ドナー由来の生殖細胞をもつ卵巣形成を確認した

ゼブラフィッシュ → キンギョ → ドジョウ

vasa遺伝子で確認 組織学的に確認 vasa遺伝子で確認

宿主の特性で卵巣が形成される

図2. 倍数性を操作したPGCIによるキメラ

手順

半数体PGC (キンギョ、ドジョウ、ゼブラフィッシュ)

宿主へ移植

生体内培養

配偶子形成の解析

倍数性 遺伝子解析 ドナー宿主の系統差による

完全ホモ接合体？

キンギョ半数体PGCからの精子形成

半数体のPGCを移植された三倍体

FCMによる検証

生精細胞(精子)

宿主に由来する配偶子 1.5n は認められない

半数体のPGCを移植された三倍体キメラに由来する精子のマイクロサテライトDNAマーカーによるクローン性検算

Donor ♀, Donor ♂, Host ♀, Host ♂, Chimera Egg, Chimera Sperm

ホモ型 (精子は遺伝的に均一)

ヘテロ型 (精子に遺伝的な多様性が存在)

母親がヘテロの6アレルで全てホモ型 → **精子はクローン**

成果と今後の展望

- 1) 目内での近縁種間の生殖系列キメラでは精子形成が可能な場合があるが、遠縁種間では困難である。
- 2) 卵巣の形成は、宿主魚種の性分化に依存して、生殖系列キメラの性も決まる可能性がある。
- 3) 致死性の半数体個体からもPGCが得られ、生殖系列キメラを利用した生体内培養で配偶子が分化する。この配偶子はクローンである可能性が示唆された。

魚類において、PGCと生殖系列キメラを利用して、植物での「接ぎ木」、「花粉培養」に相当する育種が可能であり、植物育種と同様の発展が期待できる。